Journal of Horticultural Science
https:// jhs.um.ac.ir

Research Article
Vol. 36, No. 2, Summer 2022, p. 401-414

The Improvement of Morphological, Biochemical and Antioxidant Characterizes in Mexican lime Seedlings, Inoculated by Fungal Endophyte Extracted from Green Seaweed

L. Baghazadeh Daryaii[1], D. Samsampour[2]*, A. Bagheri[3], J. Sohrabipour[4]

Received: 13-04-2021 Revised: 08-06-2021 Accepted: 13-07-2021 Available Online: 21-08-2022	**How to cite this article:** Baghazadeh Daryaii L., Samsampour D., Bagheri A., and Sohrabipour J. 2022. The Improvement of Morphological, Biochemical and Antioxidant Characterizes in Mexican lime Seedlings, Inoculated by Fungal Endophyte Extracted from Green Seaweed. Journal of Horticultural Science 36(2): 401-414. (In Persian with English abstract) **DOI**: 10.22067/JHS.2021.69603.1039

Introduction

Fungal Endophytes have symbiosis life within the plant tissues without causing any obvious negative effects. Seaweeds are one of the large and diverse groups of marine plants that play an essential role in marine and oceans ecosystems. Seaweeds show rich diversity of associated microorganisms compare with the other multicellular organisms. Citrus species, are amongst the most important evergreen fruit trees, cultivated in many countries worldwide. There are several obstacles for citrus production in southern of Iran that limiting continuity of citrus production. Lack of suitable soil, is one of the main challenges threatening citrus industry in southern of Iran. Similar to other citrus species, the production of Mexican lime is threatened by certain biological stresses (such as pests, plant diseases and weeds) and non-biological stresses (such as salinity, drought, floods, cold and heat stress). Here, we have evaluated the potential of inoculating Mexican lime seedlings with seaweeds fungi endophyte, *Aspergillus niger*, to improve morphological, biochemical, antioxidant and photosynthesis pigments characterizes. Endophytes are advantageous group of microorganisms that protect plants from biotic and abiotic stresses. One of the alternative ways to restore normal plant growth may be to use plant growth to stimulate endophytes. Endophytes can play an important role in plant growth. Endophytes from marine environment are gaining special interest because of their existence in the harsh conditions of marines and ocean ecosystem such as temperature, light availability, high salinity and osmotic stress. Fungi have already been isolated from various marine habitat, including marine plants, marine invertebrates and vertebrates. Among these organisms, seaweeds are one of the most prevalent sources of marine-derived fungi for chemical studies. The purpose of this study was the isolation of associated fungi with seaweed species in Persian Gulf to investigate morphological and molecular characterization by using PCR amplifications ITS1-5.8S-ITS4 regions and primitive assessment of their potential as bio-fertilizer.

Materials and Methods

The main aim of this study was investigation the role of endophytic fungi (*Aspergillus niger*), in improving the growth of Mexican lime seedlings. *Cladophoropsis membranacea*, green seaweed, was collected from coastal region of Bushehr province. Fungal endophytes were isolated and identified based on morphological and molecular methods. Molecular characteristic was investigated using PCR amplification of ITS1-5.8S-ITS4 regions. Mexican lime seeds were sterilized with 0.5% sodium hypochlorite for 20 minutes and then completely distilled three times

1 and 2- Ph.D. in Horticultural Science and Associate Professor, Agriculture and Natural Resources College, University of Hormozgan, respectively.
(*- Corresponding Author Email: Samsampoor@hormozgan.ac.ir)
3- Assistant Professor, Plant Protection Research Department, Hormozgan Agricultural and Natural Resources Research and Education Center
4- Assistant Professor, Department of Natural Resources Researches, Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, Bandar Abbas, Iran

with distilled water. Seedlings pots containing autoclaved soil were placed in the greenhouse of the Faculty of Agriculture, Hormozan University. Isolated fungi by MT420720 accession number was used as bio-fertilizing agents in eight months old Mexican lime seedlings. The suspension was adjusted to a concentration of 1×10^{6} cell per ml. For better contact of seedlings with fungi, inoculation was performed three times. After three months, morphological (trunk diameter, stem length, root length and width, leaf and branch number, leaf, stem and root dry and fresh weight), biochemical (Protein, MDA and SPAD), antioxidant (CAT, POD, SOD, APX and Gr enzymes activity) and photosynthesis pigments (Chlorophyll a, Chlorophyll b, Total Chlorophyll and Carotenoids) characterizes in treated Mexican lime seedlings were analyzed. The experiment was arranged in randomized complete design with three replications. Analysis of variance of traits was performed using SAS software version 9.4 and the means were compared using LSD method with a probability level of $P\leq0.05$.

Results and Discussion

The genera of *Aspergillus* was the most frequent isolates of the isolated fungi. The results show that most traits were significant compared with control. For example, leaf number (144.42%), root fresh weight (144.13%), stem fresh weight (94.85%) and root width (105.55%) were significantly higher compared with control ($P>0.001$). Fungal inoculation can significantly improve the photosynthesis pigments such as chlorophyll a (10.98%) and carotenoids (40.62%) ($P>0.001$) compared with control. In antioxidant capacity of seedling, CAT, POD, SOD, Gr and APX enzymes were analyzed. Fungal inoculation can increase the enzymes activity. For biochemical traits, fungal inoculation can significantly increase SPAD number and decrease MDA in inoculated seedlings compare with control ($P>0.001$).

Conclusion

The results showed that the use of entophytic fungi increased the growth of Mexican lime seedlings. Thereby it can be used as an effective tool for growing salinity-sensitive plants such as Mexican lime in saline conditions.

Keywords: Abiotic stress, Fungal entophytes, Photosynthesis pigments, Seaweeds

نشریه علوم باغبانی
https:// jhs.um.ac.ir

مقاله پژوهشی
جلد ۳۶، شماره ۲، تابستان ۱۴۰۱، ص ۴۱۴-۴۰۱

ارتقاء صفات مورفولوژیک، بیوشیمیایی و آنتی اکسیدانی دانهال‌های مکزیکن لایم تلقیح شده با اندوفیت قارچی استخراج شده از جلبک سبز

لیلا بقازاده دریایی[1]- داود صمصام پور[2]*- عبدالنبی باقری[3]- جلوه سهرابی پور[4]

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۱/۲۴
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۴/۲۲

چکیده

اندوفیت‌ها میکروارگانیسم‌های مفیدی هستند که نقش مهمی در محافظت از گیاهان در برابر عوامل بیماری‌زا و تنش‌های غیرزیستی ایفا می‌کنند. این مطالعه با هدف استفاده از اندوفیت قارچی *Aspergillus niger* همزیست با جلبک سبز *Cladophoropsis membranacea* برای ارتقا صفات مورفولوژیک، بیوشیمیایی، آنتی اکسیدانی و رنگدانه‌های فتوسنتزی دانهال‌های مکزیکن لایم صورت گرفته است. از مناطق ساحلی شهرستان بوشهر، نمونه جلبک جمع‌آوری شد. اندوفیت قارچی بر اساس مورفولوژیک و مولکولی بر پایه تکثیر نواحی ITS1 و ITS4 با استفاده از تکنیک PCR مورد شناسایی قرار گرفت. بذور استریل شده مکزیکن لایم در سینی‌های کشت حاوی پیت‌ماس اتوکلاو شده کشت و در مرحله چهار برگی به گلدان‌های جدید منتقل شدند. هشت ماه بعد، تلقیح انجام و پس از سه ماه صفات مورفولوژیک، بیوشیمیایی، آنتی اکسیدانی و میزان رنگدانه‌های فتوسنتزی مورد ارزیابی قرار گرفتند. آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام شد. نتایج نشان دادند، اکثر صفات مورد بررسی، اختلاف معنی‌داری نسبت به نمونه‌های شاهد داشتند. از جمله صفات مورفولوژیک اندازه‌گیری شده می‌توان به افزایش تعداد برگ (۱۴۴/۴۲ درصد)، وزن تر ریشه (۱۴۴/۱۳ درصد)، وزن تر ساقه (۹۴/۸۵ درصد) و عرض ریشه (۱۰۵/۵۵ درصد) نسبت به گیاه شاهد اشاره کرد که اکثراً در سطح ۱ درصد معنی‌دار بودند. اندوفیت قارچی توانسته بود سطح رنگدانه‌های فتوسنتزی از جمله کلروفیل آ (۱۰/۹۸ درصد) و کاروتنوییدها (۴۰/۶۲ درصد) را به‌طور معنی‌داری نسبت به شاهد افزایش دهد. در بررسی ظرفیت آنتی اکسیدانی دانهال‌ها، آنزیم‌های کاتالاز، پراکسیداز، سوپراکسید دیسموتاز، گلوتاتیون ردوکتاز و اسکوربیک پراکسیداز اندازه‌گیری شدند. اندوفیت توانسته بود باعث روند افزایشی آنزیم‌های آنتی اکسیدانت در دانهال‌های مکزیکن لایم پس از تلقیح شود. همچنین، اندوفیت قارچی توانسته بود باعث افزایش معنی‌دار عدد اسپد و کاهش معنی‌دار مالون دی آلدئید در دانهال‌های تلقیح شده نسبت به شاهد شود. به‌طورکلی، اندوفیت‌های قارچی همزیست با ماکروجلبک‌ها می‌توانند به‌عنوان گزینه مناسبی برای افزایش تحمل گیاهان نسبت به تنش‌های زیستی و غیر زیستی از جمله شوری مورد توجه واقع شوند.

واژه‌های کلیدی: اندوفیت قارچی، تنش غیرزیستی، جلبک‌های دریایی، رنگدانه‌های فتوسنتزی

مقدمه

اندوفیت‌ها میکروارگانیسم‌های مفیدی هستند که از دامنه میزبانی وسیع و خاصیت تحریک‌کنندگی رشد گیاه برخوردار می‌باشند (Strobel *et al.*, 2004). اندوفیت‌ها با ایجاد تغییرات فیزیولوژیک، ژنتیکی و بوم شناختی در گیاهان میزبان خود، عملکرد آن‌ها را در واحد سطح افزایش داده و امکان توسعه کشت آن‌ها را در خاک‌های

۱ و ۲- به‌ترتیب دکتری تخصصی علوم باغبانی و دانشیار علوم باغبانی، دانشگاه هرمزگان
(*- نویسنده مسئول: Email: Samsampoor@hormozgan.ac.ir)
۳- استادیار اداره تحقیقات گیاه‌پزشکی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی هرمزگان
۴- استادیار گروه تحقیقات منابع طبیعی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی، هرمزگان، بندرعباس، ایران

DOI: 10.22067/JHS.2021.69603.1039

شـور، خشـک یا اقلیم‌هایی با تنش‌های غیرزیسـتی و زیسـتی فراهم می‌آورنـد (Strobel *et al.*, 2004). قـارچ‌هـای انـدوفیـت بـا تولید متابولیت‌های ثانویه باعث تقویت شرایط تغذیه‌ای، آبی و فیزیکی گیاه، نقش مهمی در محـافظـت از گیـاهـان در برابر عوامـل بیمـاری‌زا و تنش‌های غیرزیسـتی ایفا می‌کنند. متابولیت‌های تولید شـده توسـط قـارچ‌های اندوفیت می‌توانند اثر سـمی روی قارچ‌های بیماری‌زای گیاهی، نماتدها، حشـرات و گیاه‌خواران داشـته باشـند (Bacon and Hinton, 2007). قـارچ‌هـا از طریق محـل زخم یـا روزنـه وارد گیاه می‌شـوند و در بافت‌های مریستمی استقرار می‌یابند (White *et al.*, 1991). برخی از اندوفیت‌ها فقط یک میزبان دارند و این درحالیسـت کـه برخی دیگر قـادرند در گونه‌های مختلف گیاهی کلونیزه شـوند (Tan and Zou, 2001).

بر اسـاس مطالعات اخیر، صـدها ترکیب فعال زیسـتی نظیر: آلکـالوئیـدهـا، ترپنوئیـدهـا، فلاونوئیدها، اسـتروئیدها، بنزوپیرانون‌ها، کوئینون‌هـا، آنتی‌بیوتیـک‌هـا، عوامل ضـدسـرطان و عوامل کنترل بیولوژیک از قارچ‌های اندوفیت گزارش شـده اسـت (Kjer *et al.*, 2010).

اکوسـیسـتم‌های دریایی دارای منابع منحصـر به‌فردی در زمینه ترکیبات فعال زیستی هستند، زیرا موجودات دریایی از نظر بیولوژیک، بیوشـیمیایی و بیوسـنتزی منحصر به‌فرد هستند (Molinski *et al.*, 2009; Mayer *et al.*, 2011; Gerwick and Moore, 2012; and Newman and Cragg, 2014). قارچ‌های اندوفیت به‌دسـت آمده از محیط‌های دریایی، بدون این‌که به میزبان خود خسارتی وارد نمایند در بافت درونی میزبان خود زندگی و باعث تولید ترکیبات فعال زیسـتی طبیعی بـا سـاخـتـاری منحصـر بفرد شـده که ارزش دارویی دارند (Strobel and Daisy, 2003; Strobel *et al.*, 2004 and Bugni and Ireland, 2004;). جلبـک‌ها، یکی از مهم‌ترین منابع قارچ‌های به‌دسـت آمده از محیط آبی برای مطالعات شـیمیایی بوده‌اند (Rateb and Ebel, 2011). جلبک‌ها در اکوسـیستم‌های دریایی برای تغییرات محیطی از جمله شـوری بالای آب، نبود نورکافی، غلظت اکسـیژن پایین، محدودیت‌های غذایی و سموم سازگار شده‌اند (Quan *et al.*, 2008). با علم بر اینکه اندوفیت‌های گیاهان قادر به سـاختن ترکیبات فعال زیسـتی در میزبان خود هسـتند، اندوفیت‌های موجود در گیاهان دریایی و ماکروجلبک‌ها از جذابیت بیشـتری برخوردار هسـتند. آن‌ها قـادرنـد متـابولیـت‌هـای ثـانویـه مهمی را بسـازنـد که باعث تولید مکانیسم‌های دفاعی در میزبانشان می‌شود و آن‌ها را در شرایط تنش، زنـده نگـه می‌دارند. به‌همین دلیل ترکیبات طبیعی به‌دسـت آمده از اندوفیت‌های جلبک‌ها طی دو دهه اخیر و به‌خصـوص ۱۰ سـال اخیر مورد توجه قرار گرفته اسـت. از جمله ترکیباتی که از جلبک‌ها به‌دست آمده‌اند می‌توان به ترپنوئیدها، اسـتروئیدها و ترکیبات نیتروژنی اشـاره نمود (Peng *et al.*, 2016).

قـارچ‌هـای انـدوفیـت، توان تولیـد اکسـین را افزایش داده و بر فیزیولوژی گیـاه میزبان تاثیر می‌گذارند (Arnold and Lutsuzaki, 2013). بنابراین، اصـلاح گیاهان و مقاوم‌سـازی آن‌ها با اسـتفاده از میکروارگـانیسـم‌های طبیعی، برای افزایش مقاومت آن‌ها در مقابل تنش‌های زیسـتی و غیرزیسـتی، می‌تواند به‌عنوان یکی از روش‌های جدید اصلاحی معرفی شود. استفاده از اندوفیت‌ها در کشاورزی، اثرات زیسـت محیطی که با کودهای شـیمیایی از جمله نیتروژن به‌وجود می‌آینـد را کاهش می‌دهد (Mohammadi and Sohrabi, 2012). کودهای شـیمیایی از جمله نیتروژن، به‌سـرعت آب‌شـویی شده و وارد آب رودخـانـه‌هـا، دریـاچـه‌هـا یا سـیسـتـم‌های دریایی و تخریب اکوسـیستم‌های آبی می‌شود. نیتروژن به شکل‌های آمونیوم، نیترات یا نیتریک اسـید باعث کاهش کیفیت، شفافیت و وضوح هوا شده و روی رشد گیاهان تاثیر می‌گذارد (Robarge *et al.*, 2002; Driscoll *et al.*, 2003).

مکزیکن لایم (*Citrus aurantifolia* Swingle)، درختی است کوچـک متعلق بـه خـانواده مرکبـات کـه در منـاطق گرمسـیـری و نیمه‌گرمسـیری پرورش می‌یابد (Morton, 2013). این گیاه سـالیان مـدیدی اسـت که در نواحی مرکزی، بندرعباس و به‌ویژه در مناطق سرخون، میناب، رودان، دشت جیرفت و ممسنی کشت می‌شود و طبق آخرین آمار سـازمان جهانی FAO در سال ۲۰۱۶ ایران هفتمین تولید کننـده مکزیکن لایم در جهان می‌باشـد. مرکبات و به‌ویژه مکزیکن لایم، گیاهان حساس به شوری می‌باشند. شوری باعث کاهش رشد و عملکرد گیـاه می‌شـود (Ennab, 2016). وجود نمک در خاک و آب شـور یکی از محدودیت‌های کشـت این گیاه در مناطق جنوبی ایران می‌باشـد. بالا بردن ظرفیت‌های مورفولوژیک، بیوشـیمیایی و آنتی اکسیدانی در این گیاه حساس، می‌تواند تحمل آن‌را نسبت به تنش‌های زیستی از جمله خشکی و شوری و غیرزیستی از جمله گوموز، افزایش دهد. با توجه به اینکه بسیاری از زمین‌های کشاورزی ایران به سوی شـور شـدن سـیر می‌کنند، اسـتفاده از اندوفیت‌ها به‌منظور دارا بودن خواص زیسـت کودی آن‌ها می‌تواند روش امیدوارکننده‌ای باشـد و یا دسـت کم باعث شـود گیاهان مواجه شـده با تنش، رفتاری مشابه به گیاهان متحمل از خود نشـان دهند. همچنین، نتایج کاربرد این روش در زمان کوتاهی قابل مشـاهده و بررسی می‌باشد. صادقی و همکاران (Sadeghi *et al.*, 2020) انـدوفیـت‌هـای قارچی را جهت بالا بردن تحمل گیاه نارنگی (*Citrus reticulate* L.)، نسـبت به تنش خشکی مورد اسـتفاده قرار دادند. اندوفیت‌های قارچی توانسـتند باعث افزایش تحمل گیاه نارنگی تلقیح شـده نسبت به نمونه شاهد شوند. در تحقیق دیگر، مورسـی و همکاران (Morsy *et al.*, 2020)، از اندوفیت‌های قارچی *Ampelomyces* sp. و *Penicillium* sp. برای افزایش تحمل بـه تنش شـوری و خشـکی در گیاه گوجه‌فرنگی اسـتفاده کردند. اندوفیت‌ها توانسـته بودند باعث افزایش محصول، رشد، بیومس گیاه و

همچنین افزایش تحمل به شرایط تنش خشکی و شوری در گیاهان تلقیح شده نسبت به شاهد شوند.

این تحقیق از زاویه دید متفاوت، با نگرش بر پتانسیل میکروارگانیسم‌های همزیست با گیاهان دریایی (جلبک‌ها) به‌عنوان کودهای زیستی جهت ارتقاء صفات شاخص مورفولوژیک، بیوشیمیایی، آنتی اکسیدانی و رنگدانه‌های فتوسنتزی در دانهال‌های مکزیکن لایم مورد توجه قرار گرفته است. تاکنون از اندوفیت‌های جلبک‌ها برای اهداف ذکر شده استفاده نشده است و می‌توان گفت که این راهکار جدید و نوآورانه می‌باشد.

مواد و روش‌ها

نمونه تازه گونه جلبکی *Cladophoropsis membranacea* از ساحل شهرستان بوشهر (با طول جغرافیایی "۳۳ '۴۸ °۵۰ و عرض جغرافیایی "۰۵ '۵۵ °۲۸) در فصل بهار ۱۳۹۷، جمع‌آوری و به آزمایشگاه مرکزی دانشگاه هرمزگان منتقل شد. شناسایی آن‌ها با استفاده از کلیدهای شناسایی توسط اساتید مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان هرمزگان انجام گرفت (Sohrabipour and Rabiei, 2007 and Sohrabipour and Rabiei, 2008).

کشت جلبک‌ها و جداسازی اندوفیت‌های قارچی

نمونه‌های جلبک به‌مدت ۵ ثانیه در الکل ۷۰ درصد غوطه‌ور و سپس یک مرتبه با آب مقطر سترون شستشو داده شدند. نمونه‌ها به قطعاتی به‌طول ۵ میلی‌متر برش و به محیط کشت PDA (Potato Dextros Agar) منتقل شدند. سپس به‌مدت چهار هفته در درجه حرارت ۲۶ درجه سانتی‌گراد و شرایط نوری ۱۲ ساعته قرار داده شدند (Venkatachalam *et al*., 2015). پرگنه‌های قارچی رشد یافته، برای بررسی‌های بعدی به محیط کشت PDA جدید منتقل شدند.

استخراج DNA ژنومی

برای استخراج DNA از روش CTAB-SDS استفاده شد (Soltani *et al*., 2016). DNA استخراج شده در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. برای مشاهده کمیت و کیفیت DNA، از روش الکتروفورز با ژل یک درصد آگارز استفاده شد.

از آغازگرهای ذکر شده در ذیل برای انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) جهت شناسایی مولکولی اندوفیت‌های قارچی با استفاده از تکثیر نواحی حفاظت شده ITS1 و ITS4، استفاده شد:

ITS1 (5´GCGGCCATGTAGTAGAG3´)

ITS4 (5´TCCTCCGCTTATTGATATGC3´) (White *et al*., 1995).

مراحل واکنش شامل ۹۴ درجه سانتی‌گراد پنج دقیقه، ۹۴ درجه سانتی‌گراد ۴۵ ثانیه، ۵۳ درجه سانتی‌گراد ۳۰ ثانیه، ۷۲ درجه سانتی‌گراد یک دقیقه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد پنج دقیقه با ۳۵ چرخه بودند (Soltani *et al*., 2016). برای انجام واکنش از دستگاه ترموسایکل (Eppendorf, Hamburg, Germany) استفاده شد. نتایج واکنش روی ژل آگارز یک درصد مشاهده شدند.

با استفاده از میکروسکوپ نوری (مدل Kernobn 132، آلمان) با بزرگنمایی ۱۰۰، نوع اسپور، نوع دیواره و آرایش اسپورها در اندوفیت قارچی استخراج شده مورد بررسی قرار گرفت.

بذور مکزیکن لایم پس از ضدعفونی با هیپوکلریت سدیم پنج درصد در سینی‌های کشت حاوی پیت ماس سترون کشت شدند. دانهال‌ها در مرحله چهار برگی به گلدان‌های مناسب با ابعاد ۲۱×۲۲ سانتی‌متر منتقل شدند. برای تهیه خاک بسترهای کشت، ماسه بادی، پیت ماس و کود پوسیده دامی به‌ترتیب به نسبت‌های ۲: ۲: ۱ با هم به‌خوبی مخلوط و به‌مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد اتوکلاو شدند. دانهال‌ها در شرایط دمایی ۳۵-۳۰ درجه سانتی‌گراد و رطوبت ۷۰-۶۵ درصد در گلخانه دانشگاه هرمزگان نگهداری شدند. دانهال‌های هشت ماهه مکزیکن لایم طی سه مرحله و به‌صورت هفتگی، مایه‌زنی شدند. از مایه تلقیح قارچی، با تراکم 1×10^{6} اسپور در هر میلی‌لیتر برای اسپری گیاه و تزریق خاک اطراف ریشه استفاده شد. پس از گذشت ۱۲۰ روز صفات مورد نظر اندازه‌گیری شدند.

قطر تنه، با استفاده از کولیس از فاصله ۴ سانتی‌متری از سطح زمین اندازه‌گیری شد. برای اندازه‌گیری وزن خشک اندام‌ها، پس از توزین وزن تر، قسمت‌های مختلف گیاه (برگ، ریشه و شاخساره)، به‌طور مجزا در پاکت‌های کاغذی قرار داده و به‌مدت ۷۲ ساعت در آون با دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد خشک و سپس توزین شدند.

میزان کلروفیل برگ‌ها به‌روش اسپکتوفتومتری (مدل Cecil CE2501)، کلروفیل آ، ب، کل و کاروتنوئید به‌ترتیب در طول موج‌های ۴۷۰، ۶۶۳ و ۶۴۵ نانومتر اندازه‌گیری شدند (Arnon, 1949). همچنین، با استفاده از دستگاه کلروفیل‌متر (SPAD-502; Konica Minolta, Osaka, Japan)، در گلخانه، میزان کلروفیل اسپد برگ‌های کاملاً توسعه یافته، اندازه‌گیری شد.

برای اندازه‌گیری میزان پروتئین موجود در برگ‌ها از روش برادفورد (Bradfordm, 1976) استفاده شد. برای محاسبه پراکسیده شدن لیپیدها، مالون دی آلدئید (MDA) به‌عنوان محصول واکنش پراکسیده شدن اسیدهای چرب غشاء به‌روش ژانویان و ویلیام (Zhanyuan and William, 1992) اندازه‌گیری شد.

برای سنجش فعالیت آنزیم پراکسیداز، از روش چانسی و ماهلی (Chance and Maehly, 1955) استفاده شد. میزان کمی آنزیم کاتالاز، با استفاده از روش دهیندا (Dhindsa *et al*., 1981) با اندکی تغییر اندازه‌گیری شد. آنزیم سوپراکسیداز دیسموتاز، به‌روش بیچامپ و

فریدوویچ (Beauchamp and Fridovich, 1971)، اندازه‌گیری شد. برای اندازه‌گیری میزان آنزیم اسکوربیک پراکسیداز، از روش ناکانو و آسادا (Nakano and Asada, 1981) استفاده شد. سنجش آنزیم گلوتاتیون ردوکتاز، به‌روش اسمیت و همکاران (Smith *et al*., 1988) انجام شد.

تجزیه و تحلیل داده‌ها

داده‌های مربوط به نتایج حاصل از تیمار گیاه با اندوفیت با استفاده از نرم‌افزار SAS در قالب طرح کاملاً تصادفی و مقایسه میانگین‌ها با آزمون LSD در سطح ($p≤0.05$) انجام شد.

نتایج و بحث

کشت جلبک و استخراج اندوفیت قارچی

اندوفیت‌های قارچی بعد از گذشت سه هفته از بافت‌های جلبک‌ها خارج شدند و رشد خود را کامل کردند. نتایج حاصل از بررسی مولکولی اندوفیت‌های قارچی نشان دادند که اکثر اندوفیت‌های استخراج شده متعلق به گونه‌های مختلف جنس *Aspergillus* بودند. بررسی‌های میکروسکوپی اندوفیت قارچی نشان داد، جدایه F1 دارای اسپورهای گرد با آرایش خوشه‌ای و دارای دیواره عرضی در میسلیوم‌های خود بود. این قارچ متعلق به رده Ascomycota می‌باشد و جزء قارچ‌های حقیقی محسوب می‌شود. قبل از مرحله زایشی سفید رنگ و در زمان تشکیل اسپورها، به رنگ سیاه تک رنگ ظاهر شد. نمونه F1 دارای تشابه بالایی (۱۰۰ درصد) با دیگر توالی‌های گرفته شده از بانک ژن بود. اندوفیت F1 با شماره MT420720 در بانک ژن ثبت شد. در تحقیقات پیشین نیز، ونکاتاچالام و همکاران (Venkatachalam *et al*., 2015)، از ۱۹جلبک و ۱۰ علف دریایی اندوفیت‌های قارچی استخراج کردند که جنس *Aspergillus* دارای بیشترین فراوانی بود. کاریا و همکاران (Kaaria *et al*., 2015)، نیز ۳۰۶ اندوفیت از جلبک‌های مختلف قرمز، سبز و قهوه‌ای استخراج نمودند. این محققین، بیان نمودند که میکروارگانیسم‌های دریایی ترکیباتی را می‌سازند که به‌عنوان ترکیبات فعال زیستی جدید مطرح هستند و این ترکیبات می‌توانند به حفظ محیط زیست کمک کنند. نتایج آن‌ها قرابت نزدیکی با تحقیق حاضر داشت و بیشترین فراوانی اندوفیت‌های استخراج شده متعلق به گونه‌های مختلف *Aspergillus* بود. فلولینگ و همکاران (Flewelling *et al*., 2015)، قارچهای اندوفیت استخراج شده از گونه‌های مختلف جلبک را از نظر وجود ترکیبات فعال زیستی مورد بررسی قرار دادند. از ۳۲ قارچ اندوفیت، ۳۰۰ ترکیب طبیعی استخراج کردند. بیشترین ترکیبات زیستی را از جنس *Aspergillus* (۲۲ درصد) به‌دست آوردند و این قارچ بیشترین فراوانی را نیز به خود اختصاص داده بود.

بررسی صفات مورفولوژیک

استفاده از اندوفیت قارچی به‌عنوان کود زیستی در دانهال‌های مکزیکن لایم توانسته بود در بسیاری از صفات مورد بررسی، تفاوت معنی‌داری را نسبت به نمونه‌های شاهد نشان دهند (جدول ۱). دانهال‌های تلقیح شده دارای قطر تنه بیشتر، تعداد برگ بالاتر و طول ساقه بلندتر نسبت به شاهد بودند. به‌منظور اندازه‌گیری بیومس دانهال‌های تلقیح شده نسبت به شاهد، وزن تر و خشک ریشه، ساقه و برگ به‌طور مجزا اندازه‌گیری شدند. نتایج نشان دادند که نمونه‌های تیمار شده با اندوفیت قارچی، به‌طور معنی‌داری دارای وزن تر و خشک ساقه، ریشه و برگ بالاتری نسبت به شاهد بودند (در سطح یک درصد) (جدول ۲ و شکل ۱). در مورد وزن خشک اندام‌ها، وزن خشک برگ، ساقه و ریشه در سطح یک درصد معنی‌دار بودند (جدول ۲). این افزایش رشد را می‌توان این‌گونه توصیف کرد که، افزایش هورمون‌های گیاهی باعث تاثیر مثبت روی رشد و تکثیر سلول‌های گیاهی از جمله سلول‌های ریشه می‌شوند. افزایش رشد و گسترش سیستم ریشه‌ای باعث بهبود روابط آبی و همچنین جذب بهتر عناصر غذایی در گیاه و در نهایت رشد بهتر گیاه شده است. بیشترین تاثیر اندوفیت‌ها در گیاهان تلقیح شده در تحقیقات گذشته، روی افزایش رشد شاخساره و رشد سیستم ریشه‌ای در گیاهان بوده است (Naveed *et al*., 2014 and Golparyan *et al*., 2018). قارچ‌های اندوفیت با تولید متابولیت‌های ثانویه مخصوصا هورمون‌هایی مانند اکسین و جیبرلین باعث القای رشد معنی‌داری در گیاه میزبان خود می‌شوند (Nanda *et al*., 2018).

رنگدانه‌های فتوسنتزی

با افزایش تعداد برگ و گستردگی ریشه در گیاه، مقاومت گیاه از طریق بالا رفتن توان جذب مواد غذایی از خاک و همچنین افزایش ظرفیت فتوسنتزی، افزایش خواهد یافت. اندوفیت قارچی توانسته بود به‌طور معنی‌داری باعث افزایش کلروفیل آ و کل شود (شکل ۲). اما میزان کلروفیل ب با اختلاف اندک، از نمونه شاهد بیشتر و غیرمعنی‌دار بود. میزان کلروفیل آ و کارتنوئید موجود در برگ دانهال‌های تلقیح شده در سطح یک درصد معنی‌دار بودند، اما سطح معنی‌داری کلروفیل کل در سطح پنج درصد معنی‌دار بود. در تحقیق پیشین نیز همین نتایج در تلقیح گیاه ذرت و موز با اندوفیت قارچی به‌دست آمده است (Rodrigues *et al*., 2000). نتایج تحقیق آن‌ها نشان دادند، برخلاف معنی‌داری میزان کلروفیل آ و کاروتنوئیدها، میزان کلروفیل ب کمتر از نمونه‌های شاهد بوده است.

جدول ۱- نتایج تجزیه واریانس تاثیر تلقیح اندوفیت قارچی *Aspergillus niger* بر صفات مورفولوژیک دانهال‌های مکزیکن لایم

Table 1- The ANOVA results for the effect of *Aspergillus niger* endophytic fungi inoculation on morphological characterizes of Mexican lime seedlings

منابع تغییر S.O.V	درجه آزادی df	میانگین مربعات Mean squares					
		قطر تنه Trunk Diameter	تعداد برگ Leaf No.	تعداد انشعاب Branch No.	طول ساقه Stem length	عرض ریشه Root width	طول ریشه Root length
اندوفیت Endophyte	1	4.67	51.33	5	42	55.5	32.16
شاهد Control	1	3.58	21	3.66	20	27	29.5
ارزش *F* *F* Value		24.62*	267.13**	4ns	84.41**	138.91**	2.12ns
خطای آزمایش E	4	0.07	5.16	0.66	8.5	6.62	5.04
ضریب تغییرات C.V		6.49	6.28	18.84	9.40	6.23	7.28
مجموع مربعات اشتباه SSE		0.28	20.66	2.66	34.00	26.50	20.16
میانگین مربعات اشتباه MSE		0.07	5.16	0.66	8.50	6.62	5.04
درصد تغییرات (%) Percentage of changes		30.44	144.42	36.61	110	105.55	9.01

ns، * و **، به‌ترتیب، غیر معنی‌دار و معنی‌دار در سطح پنج و یک درصد

ns, ** and *: non-significant, significant at $p\leq 0.01$ and $p\leq 0.05$, respectively

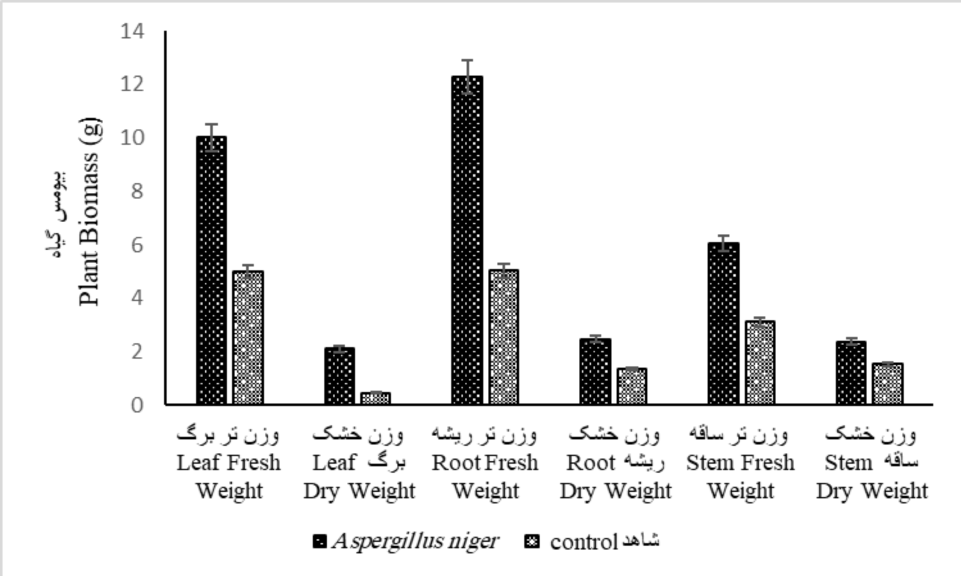
جدول ۲- نتایج تجزیه واریانس تاثیر تلقیح اندوفیت قارچی *Aspergillus niger* روی بیومس دانهال‌های مکزیکن لایم

Table 2- Results of the ANOVA of *Aspergillus niger* endophytic fungi inoculation effect on biomass of Mexican lime Seedlings

منابع تغییر S.O.V	درجه آزادی df	میانگین مربعات Mean squares					
تیمار (Treatment)		وزن تر برگ LFW	وزن خشک برگ LDW	وزن تر ریشه RFW	وزن خشک ریشه RDW	وزن تر ساقه SFW	وزن خشک ساقه SDW
اندوفیت (Endophyte)	1	10.02	2.11	12.28	2.47	6.06	2.37
شاهد (Control)	1	4.99	0.45	5.03	1.36	3.11	1.53
ارزش *F* *F* Value		186.35**	976.56**	339.21**	21.81*	92.35**	283.50**
اشتباه آزمایشی E	4	0.2	0.00	0.23	0.08	0.14	0.00
ضریب تغییرات C.V		6.00	5.08	5.56	15.26	8.20	3.12
مجموع مربعات اشتباه SSE		0.81	0.01	0.92	0.34	0.56	0.01
میانگین مربعات اشتباه MSE		0.20	0.00	0.23	0.08	0.14	0.00
درصد تغییرات (%) Percentage of changes		100.8	367.88	144.13	81.61	94.85	54.9

* و **، به‌ترتیب، معنی‌داری در سطح پنج و یک درصد

ns, ** and *: non-significant, significant at $p\leq 0.01$ and $p\leq 0.05$, respectively



شکل ۱- تاثیر تلقیح اندوفیت قارچی *Aspergillus niger* روی بیومس دانهال‌های مکزیکن لایم

Figure 1- The effect of the *Aspergillus niger* endophytic fungi inoculation on biomass of Mexican lime seedlings (LSD, $p\leq0.05$)

تفاوت در مقدار کلروفیل ب می‌تواند به‌دلیل تفاوت در ساختار و کمپلکس‌های موجود در آن باشد. از آنجایی‌که کلروفیل یک جزء حیاتی برای فتوسنتز است، هر گونه کاهش در مقدار کلروفیل می‌تواند بر ظرفیت فتوسنتز گیاه تاثیر بگذارد (Newman *et al*., 2003 and Bu *et al*., 2012).

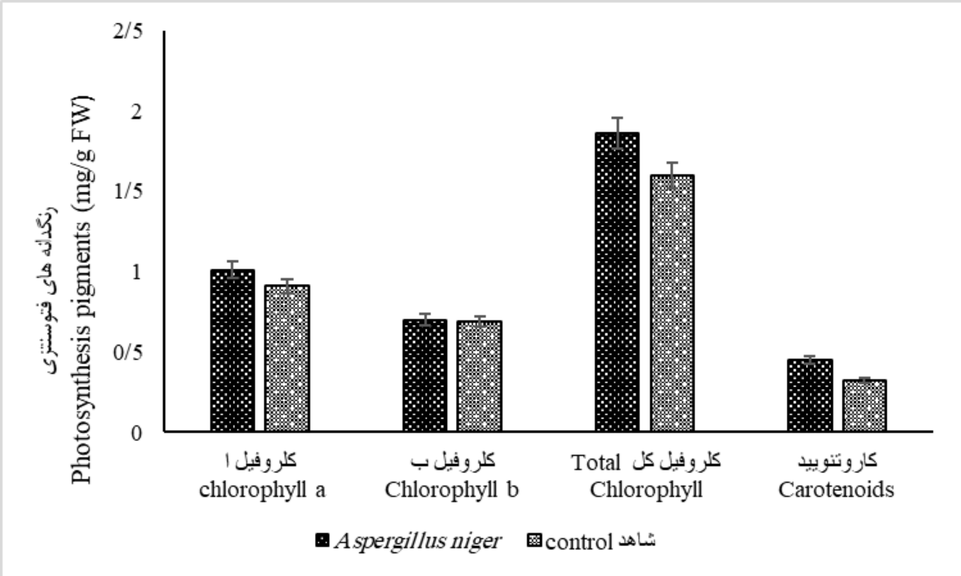
جدول ۳- نتایج تجزیه واریانس تاثیر تلقیح اندوفیت قارچی *Aspergillus niger* روی کلروفیل آ، کلروفیل ب، کلروفیل کل و میزان کاروتنوئیدهای موجود در دانهال‌های مکزیکن لایم

Table 3- Results of the ANOVA of *Aspergillus niger* endophytic fungi inoculation effect on chlorophyll a, chlorophyll b, total chlorophyll and carotenoids content in Mexican lime seedlings

منابع تغییر S.O.V تیمار (Treatment)	درجه آزادی df	میانگین مربعات Mean squares کلروفیل آ Chlorophyll a	کلروفیل ب Chlorophyll b	کلروفیل کل Total chlorophyll	کاروتنوئیدها Carotenoids
اندوفیت (Endophyte)	1	1.01	0.7	1.86	0.45
شاهد (Control)	1	0.91	0.69	1.6	0.32
ارزش *F* / *F* Value		105.00**	1.50[ns]	20.08*	253.50**
خطای آزمایشی E	4	0.00	0.00	0.00	0.00
ضریب تغییرات C.V		1.04	1.43	4.10	2.59
مجموع مربعات اشتباه SSE		0.00	0.00	0.02	0.00
میانگین مربعات اشتباه MSE		0.00	0.00	0.00	0.00
درصد تغییرات (%) Percentage of changes		10.98	1.44	16.25	40.62

ns، * و **، به‌ترتیب، غیر معنی‌دار و معنی‌دار در سطح پنج و یک درصد

ns, ** and *: non-significant, significant at $p\leq0.01$ and $p\leq0.05$, respectively.



شکل ۲- تاثیر تلقیح اندوفیت قارچی *Aspergillus niger* روی رنگدانه‌های فتوسنتزی در دانهال‌های مکزیکن لایم

Figure 2- The effect of the *Aspergillus niger* endophytic fungi inoculation on photosynthesis pigments of Mexican lime seedlings (LSD, $p \leq 0.05$)

به‌نظر می‌رسد، جذب بهتر آب منجر به جذب بهتر عناصر ضروری از جمله آهن، منگنز و فسفر شده است که در سنتز کلروفیل نقش اساسی دارند (Auge et al., 2001 and Jogawat et al., 2013). در تحقیق انجام شده توسط ژانگ و نان (Zhang and Nan, 2007)، نیز گزارش شده است که اندوفیت‌های قارچی توانسته بودند باعث افزایش سطح کلروفیل در گندم رقم *Elymus dahuricus* شوند. کاروتنوئیدها، از لیپیدهای موجود در غشاء تیلاکوییدها محافظت می‌کنند و نقش آنتی اکسیدانی دارند (Bu *et al*., 2012). دانهال‌های تلقیح شده، از مقدار کاروتنوئیدهای بالاتری نسبت به شاهد برخوردار بودند (شکل ۲).

نتایج حاصل از بررسی‌های بیوشیمیایی

نتایج بررسی بیوشیمیایی دانهال‌های مکزیکن لایم نشان دادند، میزان تولید پروتئین موجود در دانهال‌های تلقیح شده نسبت به شاهد از اختلاف معنی‌داری برخوردار بود (در سطح پنج درصد). اندوفیت قارچی توانسته بود به‌طور معنی‌داری (در سطح یک درصد) میزان کلروفیل عدد اسپد را در گیاه تلقیح شده نسبت به شاهد افزایش دهد. همچنین، مقدار کلروفیل عدد اسپد (۲۶/۰۸ درصد) و پروتئین موجود در برگ دانهال‌های تلقیح شده (۶/۸۶ درصد) افزایش نشان دادند. علاوه‌براین، با وجود عدم اعمال شرایط تنش روی گیاه، اندوفیت توانسته بود به‌طور معنی‌داری باعث استحکام دیواره سلولی نسبت به نمونه شاهد شود و میزان مالون دی آلدئید موجود در برگ دانهال‌های تلقیح شده را به‌میزان ۷۲/۳ درصد (۱/۳۶ نانومول در گیاهچه تلقیح شده و ۴/۹۱ نانومول در شاهد) نسبت به نمونه شاهد کاهش دهد (در سطح یک درصد) (جدول ۴). در تحقیقات گذشته نیز نشان داده شده است که اعمال اندوفیت‌های قارچی به گیاه گندم و برنج، توانسته بود باعث کاهش تولید ترکیب مالون دی آلدئید در آن‌ها شود (Zhang *et al*., 2010; Shukla *et al*., 2012).

ظرفیت آنتی اکسیدانی

در بررسی ظرفیت آنتی اکسیدانی دانهال‌های تلقیح شده نسبت به نمونه‌های شاهد، همه موارد مورد بررسی اختلاف معنی‌داری را از خود نشان دادند (جدول ۵ و شکل ۳). بررسی ظرفیت آنتی اکسیدانی گیاه از طریق سنجش فعالیت آنزیمی آنزیم‌های کاتالاز، پراکسیداز، سوپراکسید دیسموتاز، اسکوربیک پراکسیداز و گلوتاتیون ردوکتاز انجام گرفت. سوپراکسید دیسموتاز اولین خط دفاعی گیاهان در برابر اکسیده شدن می‌باشد (Alscher *et al*., 2002). قارچ اندوفیت توانست باعث افزایش ۱/۴ برابری فعالیت این آنزیم نسبت به شاهد شود. کاتالازها پروتئین‌های آنزیمی هستند که سلول‌های زنده را در برابر صدمات اکسیداتیو محافظت می‌کنند و باعث تغییر O^- و H_2O_2 به شکل O_2 و H_2O می‌شوند (Quan *et al*., 2008; Halo *et al*., 2015). در تحقیق حاضر، اندوفیت قارچی توانسته بود باعث افزایش معنی‌دار مقدار کاتالاز در نمونه‌های تلقیح شده شود (۱۱۰/۴۹ درصد).

جدول ۴- نتایج تجزیه واریانس تاثیر تلقیح اندوفیت قارچی *Aspergillus niger* روی کلروفیل اسپد، میزان پروتئین و مالون دی آلدئید در دانهال-های مکزیکن لایم

Table 4- Results of the ANOVA of *Aspergillus niger* fungi endophyte inoculation effect on SPAD chlorophyll number, Protein and MDA content in Mexican lime seedlings

منابع تغییر **S.O.V**	درجه آزادی **df**	میانگین مربعات **Mean squares**		
تیمار **(Treatment)**		اسپد **SPAD**	پروتئین **Proteins**	مالون در آلدئید **MDA**
اندوفیت (Endophyte)	1	68	33.27	1.36
شاهد (Control)	1	53.93	31.14	4.91
ارزش *F* *F* Value		208.04**	9.10*	3081.26*
خطای آزمایشی E	4	1.42	0.74	0.00
ضریب تغییرات C.V		1.95	2.68	3.04
مجموع مربعات اشتباه SSE		5.70	2.99	0.03
میانگین مربعات اشتباه MSE		1.42	0.00	1.42
درصد تغییرات (%) Percentage of changes		26.08	6.86	-72.3

* و **، به‌ترتیب، معنی‌دار در سطح پنج و یک درصد

** and *: significant at $p \le 0.01$ and $p \le 0.05$, respectively.

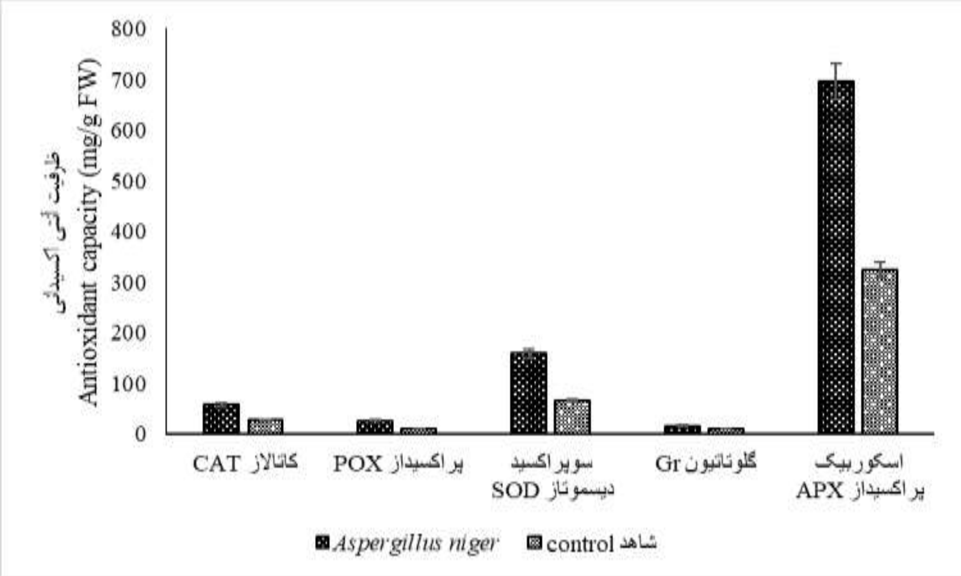
جدول ۵- نتایج تجزیه واریانس تاثیر تلقیح اندوفیت قارچی *Aspergillus niger* بر ظرفیت آنتی اکسیدانی دانهال‌های مکزیکن لایم

Table 5- Results of the ANOVA of *Aspergillus niger* fungi endophyte inoculation effect on antioxidant capasity in Mexican lime seedlings

منابع تغییر **S.O.V**	درجه آزادی **df**	میانگین مربعات **Mean squares**				
تیمار **(Treatment)**		کاتالاز **CAT**	پراکسیداز **POD**	سوپراکسیددیسموتاز **SOD**	گلوتاتیون ردوکتاز **Gr**	اسکوربیک پراکسیداز **APX**
اندوفیت (Endophyte)	1	57.15	26.25	158.61	16.24	696.42
شاهد (Control)	1	27.15	9.83	66.22	10.48	324.28
ارزش *F* *F* Value		1280.21**	479.01**	104578**	41.05*	4112.76**
خطای آزمایشی E	4	1.05	0.84	0.12	1.21	50.51
ضریب تغییرات C.V		2.43	5.09	0.31	8.24	1.39
مجموع مربعات اشتباه SSE		4.21	3.38	0.48	4.85	202.04
میانگین مربعات اشتباه MSE		1.05	0.84	0.12	1.21	50.51
درصد تغییرات (%) Percentage of changes		110.49	167.03	139.51	54.96	114.75

*، ** به‌ترتیب، معنی‌دار در سطح پنج درصد و یک درصد

** and *: significant at $p \le 0.01$ and $p \le 0.05$, respectively.



شکل ۳- تاثیر تلقیح اندوفیت قارچی *Aspergillus niger* روی ظرفیت آنتی اکسیدانی دانهال‌های مکزیکن لایم.

Figure 3- The effect of the *Aspergillus niger* endophytic fungi inoculation on Antioxidant capacity of Mexican lime seedlings (LSD, *p*≤0.05).

آنزیم‌های گلوتاتیون ردوکتاز و اسکوربیک پراکسیداز جزو آنزیم‌های آنتی اکسیدانی هستند که در تنش‌ها اکسیداتیو، از طریق مکانیسم سم‌زدایی از صدمه دیدن گیاه جلوگیری می‌کنند (Asada, 1994; Gill *et al.*, 2013). در این چرخه، آن‌ها از طریق احیای H_2O_2 باعث تبدیل این ترکیب به آب می‌شوند. نتایج نشان دادند، اندوفیت قارچی به‌طور معنی‌داری باعث افزایش فعالیت این دو آنزیم (۵۴/۹۶ درصد آنزیم گلوتاتیون ردوکتاز و ۱۱۴/۷۵ درصد آنزیم اسکوربیک پراکسیداز) در دانهال‌های مکزیکن لایم تلقیح شده نسبت به نمونه‌های شاهد شود (شکل ۳). در مقابله گیاه با تنش‌های زیستی و غیرزیستی و شرایط نامساعد محیطی، هر چه ظرفیت آنتی اکسیدانی گیاه بالاتر باشد، توانایی گیاه برای مقابله با شرایط نامساعد بالاتر خواهد بود. عدم تجمع رادیکال‌های آزادی چون O^- یا H_2O_2 در گیاهان تحت شرایط تنش، به‌دلیل وجود آنزیم‌های آنتی اکسیدانی چون کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز می‌باشد (Naveed *et al.*, 2014).

نتیجه‌گیری

میکروارگانیسم‌ها، عناصر غذایی مهم مورد نیاز گیاهان مانند نیتروژن و فسفات را از فرم غیر قابل حل به فرم قابل حل درآورده و از این طریق رشد گیاهان را بهبود می‌بخشند (Rokhzadi *et al.*, 2008). در تحقیقات پیشین، نقش میکروارگانیسم‌های خاک در کشاورزی پایدار مورد بررسی و مطالعه قرار گرفته است (Lee and Pankhurst, 1992; Wani *et al.*, 1995). محمدی (Mohammadi, 2010) نشان داد، استفاده از قارچ *Trichoderma fungi* به‌عنوان کود زیستی توانسته بود اثر معنی‌داری بر رشد، ارتفاع و تولید دانه در گیاه کانولا نسبت به نمونه‌های شاهد داشته باشد. همچنین، با کاهش مصرف کودهای شیمیایی، علاوه‌بر کاهش هزینه‌ها، از آلودگی محیط زیست نیز جلوگیری می‌شود. میکروارگانیسم‌هایی که به‌طور معمول برای کود زیستی استفاده می‌شوند، یا تثبیت کننده نیتروژن هستند، یا حل کننده فسفات و یا هر دو ویژگی را دارند (Mohammadi and Sohrabi, 2012). جدایه‌های قارچی جنس *Aspergillus* بیشتر توانایی حل کنندگی فسفات را دارا می‌باشند (Noorjahan *et al.*, 2019) و این عنصر را از فرم غیر قابل حل به فرم قابل حل درآورده و در اختیار گیاه قرار می‌دهند. در این تحقیق، با استناد به تحقیقات پیشین از جنس *Aspergillus* برای هدف کود زیستی روی دانهال‌های مکزیکن لایم استفاده شد. تلقیح اندوفیت قارچی *A. niger*، به گیاه مکزیکن لایم، باعث بهبود صفات مورد بررسی در آن شد. تلقیح قارچ باعث افزایش ارتفاع گیاه، میزان کلروفیل آ، کلروفیل کل و کارتنوئیدها و افزایش میزان پروتئین در دانهال‌های تلقیح شده شد. بر اساس یافته‌های پژوهش حاضر، این اندوفیت قارچی قابلیت استفاده به‌عنوان کود زیستی را دارا بوده و می‌تواند به‌عنوان گزینه‌ای مناسب برای افزایش تحمل گیاهان نسبت به تنش‌های محیطی از جمله تنش شوری و خشکی مطرح شود. این موضوع می‌تواند به‌عنوان یک روش مناسب در جهت ایجاد کشاورزی پایدار و دوستدار محیط زیست، در کاهش اثرات منفی کودهای شیمیایی مطرح شود. اگر چه این تحقیق اولین گزارش از اندوفیت‌های قارچی همزیست با جلبک‌های دریایی و تلقیح آن‌ها به گیاه می‌باشد،

اما تحقیقات بیشتری در زمینه شناسایی، عملکرد و جنبه‌های اکولوژیکی این اندوفیت‌ها را می‌طلبد.

استفاده از قارچ‌های اندوفیت به‌عنوان یک منبع جدید زیستی برای متابولیت‌های ثانویه فعال، از مهم‌ترین دلایل جداسازی آن‌ها بوده است (Strobel and Daisy, 2003; Schulz and Boyle, 2006). ارتباط همزیستی بین قارچ‌ها و فتواتوتروف‌ها، ممکن است روند تکاملی از زندگی آبزی به زندگی خشکی‌زی را تسهیل کرده باشد (Krings *et al.*, 2007) و برخی ساختارها، بافت‌ها و یا سلول‌های گیاهی ممکن است منشا قارچی داشته باشند (Selosse and Strullu-Derrien, 2015).

در نهایت پیشنهاد می‌شود مطالعات بیشتری در زمینه توانایی اندوفیت‌های همزیست با ماکروجلبک‌ها در افزایش تحمل گیاهان نسبت به تنش‌های زیستی و غیرزیستی از جمله شوری مورد بررسی قرار گیرد. علاوه‌براین، پیشنهاد می‌شود بررسی‌هایی روی گونه‌های مختلف جنس *Aspergillus* مانند *Aspergillus flavus* و همچنین جنس *Penicillium* مانند گونه *Penicillium chrysogenum* نیز انجام گیرد. از بررسی‌های آزمایشگاهی آن‌ها نتایج خوبی حاصل شد.

سپاسگزاری

در اینجا جا دارد از دانشگاه هرمزگان و آزمایشگاه محیط زیست استان هرمزگان تقدیر و تشکر نماییم. همچنین از خانم مهندس رام، آقای دکتر ربیعی و آقای مهندس خسروی که در نمونه‌برداری و پیشبرد پروژه همکاری صمیمانه داشتند، کمال تشکر را داریم.

منابع

1- Alscher R.G., Erturk N., Lenwood S., and Heath L.S. 2002. Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. Journal of Experimental Botany 53(372): 1331-1341.

2- Arnold A.E., and Lutsuzaki F. 2013. Diversity and Host Range of Fungal Endophytes: are rtopical leaves. Biodiversity hotspots Ecology 88: 541-549.

3- Arnon D.I. 1949. Copper enzymes in isolated chloroplast: polyphenoxidase in Beta vulgaris. Plant physiology 24: 1-15.

4- Asada K. 1994. Production and action of active oxygen species in photosynthetic tissues. In: Foyer C. & Mullineaux P.M. (eds), Causes of photooxidative stress and amelioration of defense systems in plants. CRC Press, Boca Raton, London 77- 100.

5- Auge R.M., Stodola A.J., Tims J.E., and Saxton A.M. 2001. Moisture retention properties of a mycorrhizal soil. Plant and Soil 230(1): 87-97.

6- Bacon C.W., and Hinton D.M. 2007. Bacterial endophytes: the endophytic niche, its occupants, and its utility. 155-194. In: Plant-associated bacteria. In: Gnanamanickam SS. Ed. Springer: USA.

7- Beauchamp C., and Fridovich I. 1971. Analytical Biochemistry 44(1): 276-287.

8- Bradfordm M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry.

9- Bu N., Li, X., Li, Y., Ma, C., Ma L., and Zhang C. 2012. Effects of Na_2CO_3 stress on photosynthesis and antioxidative enzymes in endophyte infected and non-infected rice. Ecotoxicology Environmental Safety 78: 35-40. https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2011.11.007.

10- Bugni T.S., and Ireland C.M. 2004. Marine-drived fungi: a chemically and biologically drived group of microorganisms. Natural product Reports 21: 143-163. https://doi.org/10.1039/B301926H.

11- Chance B., and Maehly A.C. 1955. Assay of catalases and peroxidases 764–775.
In: Colowick S.P., and Kaplan N.O. (Eds.) Methods in Enzymology. Academic Press. New York. https://doi.org/10.1016/0003-9861(77)90165-5.

12- Dhindsa R.S., Plump-Dhinsa P., and Thorpe T.A. 1981. Leaf senescence: correlated with increased levels of membrane permeability and lipid peroxidation, and decreased levels of superoxide dismutase and catalase. Journal of Experiment Botany 32: 93–101. https://doi.org/10.1016/j.jarmap.2017.06.006.

13- Driscoll C.T., Whitall, D., Aber J., Boyer E., Castro, M., Cronan, C., Goodale C.L. Groffman P., Hopkinson C., and Lambert K. 2003. Nitrogen Pollution in the Northeastern United States: Sources, Effects, and Management Options. Bioscience 53: 357. https://doi.org/10.1641/0006-3568(2003)053[0357:NPITNU]2.0.CO;2.

14- Ennab H.A. 2016. Effect of humic acid on growth and productivity of Egyptian lime trees (*Citrus aurantifolia* swingle) under salt stress conditions. Journal of Agriculture Research Kafr El-Sheikh University 42(4): 494-505.

15- Flewelling A.J., Currie, J., Gray C.A., and Johnson J.A. 2015. Endophytes from marine macroalgae: promising sources of novel natural products. Current Science 109(1): 88-111.

16- Gerwick W.H., and Moore B.S. 2012. Lessons from the past and charting the future of marine natural products drug discovery and chemical biology. Chemistry and Biology 19: 85-98. https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2011.12.014.

17- Gill S.S., Anjum, N.A., Hasanuzzaman M., Gill, R., Trivedi, D.K., Ahmad, I., Pereira E., and Tuteja N. 2013. Glutathione and glutathione reductase: a boon in disguise for plant abiotic stress defense operations. Plant Physiology

and Biochemistry 1(70): 204–212. http://dx.doi.org/10.1016/j.plaphy.2013.05.032.
18- Golparyan F., Azizi A., and Soltani J. 2018. Endophytes of *Lippia citriodora* (Syn. *Aloysia triphylla*) enhance its growth and antioxidant activity. European Journal of Plant Pathology152: 759–768. https://doi.org/10.1007/s10658-018-1520-x.
19- Halo B.A., Khan A.L., Waqas M., Al-Harrasi A., Hussain J., Ali L., Adnan M., and Lee I.J. 2015. Endophytic bacteria (*Sphingomonas* sp. LK11) and gibberellin can improve *Solanum lycopersicum* growth and oxidative stress under salinity. Journal of Plant Interactions 10(1): 117–125. https://doi.org/10.1080/17429145.2015.1033659.
20- Jogawat A., Saha S., Bakshi M., Dayaman V., Kumar M., Dua M., Varma A., Oelmüller R., Tuteja N., and Johri A.K. 2013. *Piriformospora indica* rescues growth diminution of rice seedlings during high salt stress. Plant signaling and behavior 8(10): e26891. https://doi.org/10.4161/psb.26891.
21- Kaaria P., Wakibia J., and Matiru V. 2015. Antimicrobial Screening of Marin Endophytes and Epiphytes Isolated from Marin Algae of Kenyan Indian Ocean. Journal of Applied and Environmental Microbiology 3(3): 70-74. https://doi.org/10.12691/jaem-3-3-2.
22- Kjer J., Debbab A., Aly A.H., and Proksch P. 2010. Methods for isolation of marine derived endophyticfungy and their bioactive secondary products. Nature Protocols 5: 479-490. https://doi.org/10.1038/nprot.2009.233.
23- Krings M., Taylor T.N., Hass H., Kerp H., Dotzler N., and Hermsen E.J. 2007. Fungal endophytes in a 400-million-year-old land plant: infection pathways, spatial diseribution, and host responses. New Phytology 174(3): 648-57. https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2007.02008.x.
24- Lee K.E., and Pankhurst C.E. 1992. Soil organisms and sustainable productivity. Australian Journal of Soil Research 30: 85592. https://doi.org/10.1071/SR9920855.
25- Mayer A.M., Rodrigguez A.D., Berlinck R.G., and Fusetani N. 2011. Marine pharmacology in 2007-8: marine compounds with antibacterial, anticoagulant, antifungal, anti-inflammatory, antimalarial, antiprotozoal, antituberculosis and antiviral activities; affecting the immune and nervous system and other miscellaneous mechanisms of action, Comparative biochemistry and physiology. Toxicology and Pharmacology 153: 191-222. https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2010.08.008.
26- Mohammadi K. 2010. Ecophysiological response of canola (*Brassica napus* L.) to different fertility systems in crop rotation. Ph.D thesis. Agronomy Department. Tarbiat Modares University, Tehran, Iran. 354.
27- Mohammadi K., and Sohrabi Y. 2012. Bacterial biofertilizers for sustainable crop production: a review, ARPN. Journal of Agriculture and Biolology Science 7(5): 307-316
28- Molinski T.F., Dalisay D.S., Lievens S.L., and Saludes J.P. 2009. Drug development from marine natural products. Nature Reviews Drug Discovery 8: 69-85. https://doi.org/10.1038/nrd2487.
29- Morsy M., Cleckler B., and Armuelles-Millican H., 2020. Fungal Endophytes Promote Tomato Growth and Enhance Drought and Salt Tolerance. Plants 9(7): 877. https://doi.org/10.3390/plants9070877.
30- Morton J. 2013. Mexican Lime. 168-172. In: Julia F. Morton. Fruits of Warm Climates. Miami, FL.
31- Nakano Y., and Asada K. 1981. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate specific peroxidase in spinach chloroplasts. Plant Cell Physiology 22: 867–880. https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a076232.
32- Nanda S., Mohanty B., and Joshi R.K. 2018. Endophyte-mediated host stress tolerance as a means for crop improvement. Endophyte Secondery Metabolits 2: 1-25.
33- Naveed M., Mitter B., Reichenauer T.G., Wieczorek K., and Sessitsch A. 2014. Increased drought stress resilience of maize through endophytic colonization by Burkholderia phytofirmans PsJN and Enterobacter sp. FD17, Environment. Experment Botany 97: 30–39. http://dx.doi.org/10.1016/j.envexpbot.2013.09.014.
34- Newman J.A., Abner M.L., Dado R.G., Gibson D.J., Brookings A., and Parsons A.J. 2003. Effects of elevated CO_2, nitrogen and fungal endophyte-infection on tall fescue: growth, photosynthesis, chemical composition and digestibility. Global Change Biology 9: 425–437. https://doi.org/10.1046/j.1365-2486.2003.00601.x.
35- Newman D.J., and Cragg G.M. 2014. Marine-sourced anti-cancer and cancer pain control agents in clinical and late preclinical development. Marine Drugs 12: 255-278. https://doi.org/10.3390/md12010255.
36- Noorjahan A., Aiyamperumal B., and Anantharaman P. 2019. Isolation and Charecterisation of Seaweed Endophytic Fungi as an Efficient Phosphate Solubiizers. Bioscience and Biotechnology Research. ASIA 16(1): 33-39. http://dx.doi.org/10.13005/bbra/2718.
37- Peng Z., Xin L., and Bin-Gui W. 2016. Secondary Metabolites from the Marine Algal-Derived Endophytic Fungi. Chemical Diversity and Biological Activity 82(09/10): 832–842. https://doi.org/10.1055/s-0042-103496.
38- Quan L.J., Zhang B., Shi W., and Li H.Y. 2008. Hydrogen peroxide in plants: a versatile molecule of the reactive oxygen species network. Journal of Integrative Plant Biology 50: 2-18. https://doi.org/10.1111/j.1744-7909.2007.00599.x.
39- Rateb M.E., and Ebel R. 2011. Secondary metabolites of fungi form marine habitats. Natural Product Reports 28: 290-344.
40- Robarge W.P., Walker J.T., McCulloch R.B., and Murray G. 2002. Atmospheric concentrations of ammonia and ammonium at an agricultural site in the southeast United States. Atmospheric Environment 36: 1661-1674.

41- Rodrigues Costapinto L.S., Azevedo J.L., Pereira J.O., Carneiro Viera M.L., and Labate C.A. 2000. Symptomless infection of banana and maize by endophytic fungi impairs photosynthetic efficiency. New Phytology 147: 609-615.
42- Rokhzadi A., Asgharzadeh A., Darvish F., Nourmohammadi G., and Majidi E. 2008. Influence of plant growth-promoting rhizobacteria on dry matter accumulation and yield of chickpea (*Cicer arietinum* L.) under field condition. American-Eurasian Journal of Agricultural and Environmental Sciences 3(2): 253-257.
43-Sadeghi F., Samsampour D., Seyahooei M.A., Bagheri A., and Soltani, J., 2020. Fungal endophytes alleviate drought-induced oxidative stress in mandarin (*Citrus reticulata* L.): Toward regulating the ascorbate–glutathione cycle. Scientia Horticulturae 261: 1089-1091. https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.108991.
44- Selosse M.A., and Strullu-Derrien C. 2015. Origins of the terrestrial flora: A symbiosis with fungi? EDP sciences 4, 00009. https://doi.org/1051/bioconf/ 20150400009.
45- Schulz B., and Boyle C. 2006. What are endophytes? 1–14. In Microbial Root Endophytes; Sieber, T., Eds.; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany.
46- Shukla N., Awasthi R.P., Rawat L., and Kumar J. 2012. Biochemical and physiological responses of rice (*Oryza sativa* L.) as influenced by Trichoderma harzianum under drought stress. Plant Physiology and Biochemistry 54: 78–88.
47- Smith I.K., Vierheller T.L., and Thorne C.A. 1988. Assay of glutathione-reductase in crude tissue-homogenates using 5, 5′-dithiobis (2-nitrobenzoic acid). Analytical Biochemistry 175: 408–413.
48- Sohrabipour J., and Rabiei R. 2007. The checklist of green algae of the Iranian coast lines of the Persian Gulf and Gulf of Oman. Iranian Journal of Botany 23(1): 146-149.
49- Sohrabipour J., and Rabiei R. 2008. Rhodophyta of Oman Gulf (South east of Iran). The Iranian journal of botany 14(1): 70-74.
50- Soltani J., ZaheriShoja M., Hamzei J., Hosseyni-Moghaddam M.S., and Pakvaz S. 2016. Diversity and bioactivity of endophytic bacterial community of Cupressaceae. Forest Pathology 46: 353–361. https://doi.org/10.1111/efp.12270.
51- Strobel G., and Daisy B. 2003. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products, Microbiology and Molecular Biology Reviews 67(4): 491-502. https://doi.org/10.1128/MMBR.67.4.491–502.2003.
52- Strobel G., Daisy B., Castillo U., and Harper J. 2004. Natural products from endophytic microorganism. Journal of Natural Product 67: 257-268.
53- Tan R.X., and Zou W.X. 2001. Endophytes: a rich source of functional metabolites. Natural Products Reports 18: 448–459.
54- Venkatachalam A., Guvinda R.M.B., Thirunavukkarasu N., and Suryanarayanan T.S. 2015. Endophytic fungi of marine algae and seagrasses: a novel source of chitin modifying enzymes. Mycosphere 6(3): 345-355. https://doi.org/10.5943/mycosphere/6/3/10.
55- Wani S.P., Rego T.G., Rajeshwari S., and Lee K.K. 1995. Effect of legume–based cropping systems on nitrogen mineralization potential of Vertisol. Plant Soil 175(2): 265-274.
56- White T.J., Bruns T., Lee S., and Taylor J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. 315–322. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (eds) PCR protocols: a guide to methods and applications. Academic Press, San Diego.
57- White J.F.J., Morrow A.C., Morgan-Jones G., and Chambless D.A. 1991. Endophyte-host associations in forage grasses. IV. Primary stromata formation and seed transmission in Epichloë typhina: developmental and regulatory aspects. Mycologia 83: 72-81. https://doi.org/10.1080/00275514.1991.12025979.
58- Zhang Y.P., and Nan Z.B. 2007. Growth and anti-oxidative systems change in elymus dahuricus is affected by neotyphodium endophyte under contrasting water availability. Journal of Agronomy and Crop Science 193: 377–386. https://doi.org/10.1111/j.1439-037X.2007.00279.x.
59- Zhang X., Li C., and Nan Z. 2010. Effects of cadmium stress on growth and antioxidative systems in achnatherum inebrians symbiotic with neotyphodium gansuense. Journal of Hazardous Materials 175: 703–709. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.10.066.
60- Zhanyuan D., and William J. 1992. Modified Thiobarbituric acid assey for measuring lipid oxidative in sugar rich plant tissue extracts. Journal of Agricultural and Food Chemistry 40(9): 1566-1570. https://doi.org/10.1021/jf00021a018.